





**SYSTEM OF PROBES INTENDED TO CARRY OUT THE TYPING HLA DR,
AND TYPING PROCESS USING SAID PROBES****Publication number:** JP10506541 (T)**Publication date:** 1998-06-30**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:****- international:** *C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68; C12N15/09***- European:** C12Q1/68M4**Application number:** JP19960500183T 19960603**Priority number(s):** WO1996FR00836 19960603; US19950485133 19950607**Also published as:** WO9640989 (A1)
 PL318536 (A1)
 PL184298 (B1)
 EP0772694 (A1)
 IL120158 (A)
 NZ311058 (A)
 NO970518 (A)
 JP3384806 (B2)
 AU717296 (B2)
 AU6228996 (A)
 CN1159211 (A)

<< less

Abstract not available for JP 10506541 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9640989 (A1)**

Nucleotidic probe selected amongst the following: TGGCAGCTTAAGTTT, CCTAAGAGGGAGTG, GCGAGTGTGGAACCT, AAGACAGGCGGGC, or their complementary ones. Said probes may be used to carry out the typing HLA DR of a person, particularly before the transplantation of organs.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

Family list

Approximately 24 application(s) for: JP10506541 (T)

- 1 **SONDEN SYSTEM ZUR HLA-DR CHARAKTERISIERUNG UND SIE VERWENDENDEN CHARAKTERISIERUNGS-VERFAHREN**
Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE [FR] ; GROS PHILIPPE [FR] (+3) Applicant: BIO MERIEUX [FR]
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)
Publication info: AT174064 (T) — 1998-12-15
- 2 **Probe system for performing HLA DR typing and typing method using said probes**
Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE ; GROS PHILIPPE (+3) Applicant: BIO MERIEUX
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)
Publication info: AU659866 (B2) — 1995-06-01
- 3 **System of probes intended to carry out the typing HLA DR, and typing process using said probes**
Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE ; GROS PHILIPPE (+3) Applicant: BIO MERIEUX
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; (+4)
Publication info: AU717296 (B2) — 2000-03-23
- 4 **PROBE SYSTEM FOR PERFORMING HLA DR TYPING AND TYPING METHOD USING SAID PROBES**
Inventor: PATRICE ANDRE ALLIBERT, ; PHILIPPE GROS, (+3) Applicant: BIO MERIEUX
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)
Publication info: AU2388592 (A) — 1993-02-23
- 5 **System of probes intended to carry out the typing hla dr, and typing process using said probes**
Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE ; GROS PHILIPPE (+3) Applicant: BIO MERIEUX
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; (+4)
Publication info: AU6228996 (A) — 1996-12-30
- 6 **PROBE SYSTEM FOR PERFORMING HLA DR TYPING AND TYPING METHOD USING SAID PROBES**
Inventor: ALLIBERT PATRICE A [FR] ; GROS PHILIPPE [FR] (+3) Applicant: BIO MERIEUX [FR]
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)
Publication info: CA2091775 (A1) — 1993-01-18
CA2091775 (C) — 2003-02-25
- 7 **SYSTEM OF PROBES INTENDED TO CARRY OUT THE TYPING HLA DR, AND TYPING PROCESS USING SAID PROBES**
Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE [FR] ; GROS PHILIPPE [FR] (+3) Applicant: BIO MERIEUX [FR]
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; (+5)
Publication info: CA2196921 (A1) — 1996-12-19
- 8 **System of probes intended to carry out the typing HLA DR, and typing process using said probes**
Inventor: ALLIBERT P A [FR] ; GROS P [FR] (+1) Applicant: BIO MERIEUX [FR]
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; (+4)
Publication info: CN1159211 (A) — 1997-09-10
- 9 **Sonden System zur HLA-DR Charakterisierung und sie verwendendes Charakterisierungs-Verfahren**
Inventor: ALLIBERT PATRICE [FR] ; GROS PHILIPPE [FR] (+3) Applicant: BIO MERIEUX [FR]
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)

Publication info: DE69227756 (T2) — 1999-07-29
DE69227756 (T3) — 2002-11-21

10 **SYSTEME DE SONDAS PERMETTANT D'EFFECTUER LE
TYPAGE HLA DR, ET PROCEDE DE TYPAGE UTILISANT
LESDITES SONDAS.**

Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE [FR] ; Applicant: BIO MERIEUX [FR]
GROS PHILIPPE [FR] (+3)
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)

Publication info: DK549776 (T3) — 1999-08-16
DK549776 (T4) — 2002-07-29

11 **PROBE SYSTEM FOR PERFORMING HLA DR TYPING AND
TYPING METHOD USING SAID PROBES.**

Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE [FR] ; Applicant: BIO MERIEUX [FR]
GROS PHILIPPE [FR] (+3)
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)

Publication info: EP0549776 (A1) — 1993-07-07
EP0549776 (B1) — 1998-12-02
EP0549776 (B2) — 2002-03-27
EP0549776 (B9) — 2003-03-12

12 **SYSTEM OF PROBES INTENDED TO CARRY OUT THE TYPING
HLA DR, AND TYPING PROCESS USING SAID PROBES**

Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE [FR] ; Applicant: BIO MERIEUX [FR]
CROS PHILIPPE [FR] (+3)
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; (+4)

Publication info: EP0772694 (A1) — 1997-05-14

13 **SYSTEME DE SONDAS PERMETTANT D'EFFECTUER LE
TYPAGE HLA DR, ET PROCEDE DE TYPAGE UTILISANT
LESDITES SONDAS.**

Inventor: ALLIBERT PATRICE ANDRE [FR] ; Applicant: BIO MERIEUX
GROS PHILIPPE [FR] (+3)
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)

Publication info: ES2126597 (T3) — 1999-04-01
ES2126597 (T5) — 2002-11-01

14 **SYSTEME DE SONDAS PERMETTANT D'EFFECTUER LE
TYPAGE HLA DR, ET PROCEDE DE TYPAGE UTILISANT
LESDITES SONDAS.**

Inventor: PATRICE ALLIBERT ; ANDRE (+6) Applicant: BIO MERIEUX [FR]
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; (+5)

Publication info: FR2679252 (A1) — 1993-01-22
FR2679252 (B1) — 1993-12-10

15 **System of probes intended to carry out the typing HLA DR
and typing process using said probes**

Inventor: Applicant: BIO MERIEUX [FR]
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12N15/09; C12N15/00; C12Q1/68; (+4)

Publication info: IL120158 (A) — 2000-06-29

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-506541

(43) 公表日 平成10年(1998) 6月30日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 55 頁)

(21) 出願番号 特願平9-500183
(86) (22) 出願日 平成8年(1996) 6月3日
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 2月5日
(86) 国際出願番号 PCT/FR 96/00836
(87) 国際公開番号 WO 96/40989
(87) 国際公開日 平成8年(1996) 12月19日
(31) 優先権主張番号 08/485, 133
(32) 優先日 1995年6月7日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), AU, CA, CN, I L, J P, KR, NO, NZ, P L

(71) 出願人 ビオ メリウ
フランス国 69280, マルシールエトワ
ル (番地なし)
(72) 発明者 アリバート, パトリス, アンドレ
フランス国 69290, グレツィウーラーバ
レン, レ グランジェ 18
(72) 発明者 クロス, フィリップ
フランス国 69005, リヨン, リュ デュ
コマンダントーシャルコット 90
(72) 発明者 マッハ, ベルナルド, フランソワ
スイス国 1292, シャンベシィ, ルート
デ プレグニィ 45
(74) 代理人 弁理士 松井 光夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HLA-DR型別判定の実施を可能するプローブ系および該プローブを用いる型別判定法

(57) 【要約】

- T G G C A G C T T A A G T T T - C C T A A G A
G G G A G T G - G C G A G T G T G G A A C C T -
A A G A C A G G G G G G C .

またはこれらの相補的配列から選ばれるヌクレオチドプ
ローブ。該プローブは、特に器官移植の前に、ヒトのH

L A DR型別判定を行うために用いられうる。

【特許請求の範囲】

1. 下記

- T G G C A G C T T A A G T T T
 - C C T A A G A G G G A G T G
 - G C G A G T G T G G A A C C T
 - A A G A C A G G C G G G C .

またはその相補的配列から選ばれるヌクレオチドプローブ。

2. 下記

- T G G C A G C T T A A G T T T
 - C C T A A G A G G G A G T G
 - G C G A G T G T G G A A C C T
 - A A G A C A G G C G G G C .

またはその相補的配列から選ばれた少なくとも1つのプローブを含む、HLA DR型別判定を行うことを可能にするオリゴヌクレオチドプローブのセット。

3. 下記

- G T G G A C A A C T A C T G
 - G A T A C T T C T A T C A C C A A
 - G C C T G A T G A G G A G T A C
 - T G G C A G G G T A A G T A T A A G
 - G G G C C C T G G T G G A C A

- T G C G G T A T C T G C A C A
 - G G A G G A G G T T A A G T T
 - C T G G A A G A C G A G C G
 - T G G A A G A C A A G C G G
 - T G C G G A G C A C T G G A
 - A A C C A G G A G G A G A A C G T G
 - A C T C T A C G G G T G A G T G
 - G A C A C C T A T T G C A G A C

(下線部は最小配列に対応する) またはその相補的配列から選ばれた少なくとも1つのプローブを更に含む、請求項2のプローブのセット。

4. 下記

- T G G A C A A C T A C T
 - G A T A C T T C T A T C A C C
 - C C T G A T G A G G A G T A
 - G G C A G G G T A A G T A T A A G
 - G G C C C T G G T G G A
 - G C G G T A T C T G C A C A
 - G G A G G A G G T T A A G T T
 - T G G A A G A C G A G C
 - G G A A G A C A A G C G
 - G C G G A G C A C T G G
 - A A C C A G G A G G A G A A C G T

 - C T C T A C G G G T G A G T
 - A C A C C T A T T G C A G A

またはその相補的配列から選ばれた少なくとも1つのプローブを含む、請求項3のプローブのセット。

5. 下記

- G A G G A G G A C T T G C G C T
 - T A C G G G G C T G T G G A G
 - G G A G C T G C G T A A G T
 - T T C C T G G A G A G A C A C
 - G G G A G A G A T A C T T C C.

またその相補的配列から選ばれた少なくとも1つのプローブを更に含む、請求項2または3のプローブのセット。

6. 下記

- A G G A G G A C T T G C G C
 - A C G G G G C T G T G G A
 - G A G C T G C G T A A G
 - T T C C T G G A G A G A C A C
 - G G A G A G A T A C T T C.

またはその相補的配列から選ばれた少なくとも1つのプローブを含む、請求項5のプローブのセット。

7. 下記のプローブ

- A A C C A G I A G G A G A A C G T

またはその相補的配列を含む、請求項2～6のいずれか1つに記載のプローブのセット。

8. 下記プローブ

- G C G G T G A C G G A G C T G G
 - G A A C A G C C A G A A G G A C
 - C C G G G C G G T G A C I G A G C T G G G G C

またはその相補的配列を含む、請求項2～7のいずれか1つに記載のプローブのセット。

9. オリゴヌクレオチドでの型別判定の標準的手法に従って、個人からの試料か

ら出発して個人のHLA-D R型別を判定する方法において、請求項2～8のいずれか1つに記載されるプローブのセットの少なくとも1つのサブセットを、捕捉プローブまたは検出プローブとして用いることを特徴とする方法。

10. プローブが請求項2～7のいずれか1つに記載のものから選ばれる、請求項9の方法。

11. プローブが捕捉プローブとして用いられる請求項10の方法。

12. 方法が、

- 各捕捉プローブを固体支持体上に固定化する、
 - 各固定化捕捉プローブを、少なくとも一つの核酸フラグメント標的を含む液体媒体と、プローブの配列と相補性の配列が標的中に存在するならばハイブリッド化を許す予め決めた条件下で接触させる、そして
 - 形成されるハイブリッドの存在を検出する
- より成る工程を含む請求項11の方法。

13. 各固定化捕捉プローブを、核酸標的の少なくとも一つのフラグメントを含む液体媒体と接触させる工程が、37℃で行われる請求項12の方法。

【発明の詳細な説明】

H L A - D R 型別判定の実施を可能にするプローブ系
および該プローブを用いる型別判定法

本発明は、個人のクラスII H L A 遺伝子型を決定するための方法に関し、特に多形性 H L A - D R 遺伝子の検出に係る。この方法は、特に、移植における H L A 型別判定、医療診断、法医学などに適用できる。

H L A (ヒトリンパ細胞抗原)系は、ヒトにおいて主要組織適合複合体によりエンコードされる。それは、自己と非自己を区別することによって、個人間の器官移植の間の極めて本質的な制限をもたらす。更に、H L A 因子は、多数の病気に対する素因に関与する。H L A 系の抗原は従って、器官移植における提供者と被移植者の間の特性 (F. H. バッハ及び J. J. ファン ロート、N. Engl. J. Med.、295、806~13頁、1976) ならびに或る病気に対する個人の素因を決定する型別判定法において用いられてきた。

遺伝子的観点から H L A 系は十分に特徴づけられ、そして第6染色体の短腕上の約2センチモーガン (c M) の間隔内にある多かれ少なかれ多形性の一組の座よりなる。この系中の三つの座 (H L A - A、- B 及び - C) は、相互複性的に (codominantly) 表現される同種抗原のクラス (クラス I) をコードする。事実いくつかの遺伝子を含む

他の領域 (H L A - D) は、かなりの程度の多形性を伴って相互複性的に表現される同種抗原の第二のクラス (クラス II) をコードする。特に補体カスケードの成分 C 2、C 4 及び因子 B f を制御するいくつかの他の座はまた、H L A 系 (クラス III) に属する。器官移植の成功は、被移植者と提供者の間の H L A 同一性 (クラス I 及び II) に大きく依存する。従って、H L A 型別判定は、出来るだけ正確でなければならない。この要求は主に、腎臓移植 (P. J. モリス及び A. ティン (1982) Immunol. Rev 66、103-G. オペルツ (1989) Transpl Proc. 21、609-E. L. ラガーイ、P. H. ヘンネマン、M. ルイクロクラ (1985) New Engl. J. Med. 321、701) および骨髄移植 (P. G. ビーティ、R. A. クリフト、E. M. ミケルソンら (1985) New Engl. J. Med. 313、765-J. M.

・ホウ及びB. A. ブラドリー(1990) British J. Hematol.76、1) に関する。骨髓移植においては、クラスIIHLA抗原に関する完全な同一性は、移植の成功、すなわち移植片の拒絶又は移植片対宿主の疾病の進展を妨げるための決定的因子を表わす(P. G. ビーティ、J. ハンセン、G. M. ロングトンら(1991) Transplantation 51、443-R. C. アシュ、J. T. キャスパー、C. R. チタンバーら(1990) New Engl. J. Med.322、485-C. アナセッティ、D. アモス、P. G. ビーティら(1989) New Engl. J. Med.320、197)。

HLA-D領域の遺伝子の表現産生物の多形性は、細胞

の表面で表現されたHLA遺伝子産生物の同種抗血清での分析に基づく血清学的手法により通常決定される(J. J. ファンロード及びA. ファンリュウエン(1963) J. Clin. Invest,42、1382-J. J. ファンロード、A. ファンリュウエン、J. J. コニング、A. B. ファンウドアブラス(1975) Tissue Antigens 5、73)。正確性及び再現性は、利用できる血清のバッチに依存する。しかし、最良の条件下でさえ、極めて多数の存在する対立遺伝子がこれらの血清学的手法により検出不能である。血清学的分析の限界は主に、単一特異的な同種抗血清の不存在、極めて密接に関連する特異性たとえばDR3とDRw13の間の交叉反応性の不完全な区別、あるいは細胞たとえば白血病細胞の表面におけるクラスIIHLA分子の変更された表現に起因する。

分子生物学を用いて、従来予想されていたよりもはるかに多数のHLA遺伝子、特に多くのより異なる対立遺伝子が存在することが今は知られている。この多様性は今は、種々の遺伝子及び対立遺伝子のDNA配列によって特徴づけられる。HLA命名委員会の最近のレポートによると(HLA系の因子のためのWHO命名委員会(1990) Immunogenetics 31、131-及びJ. G. ボドマー、S. G. E. マーシュー、E. D. アルバート、W. F. ボドマー、B. デュボン、H. A. アーリッヒ、B. マッハ、W. R. メイア、P. パラム、T. ササズキ、G. M. T. シュロイダー、J. L. ストロミンガー、A. スビガード

及びP. I. テラサキ(1991) Tissue Antigens37、97参照)、クラスIIHLA

多形性は、下記のように分布される。DRB1座：47の対立遺伝子、DRB3座：4の対立遺伝子、DRB4座：1の対立遺伝子、DRB5座：4の対立遺伝子、DQB1座：17の対立遺伝子、DQA1座：13の対立遺伝子、DPB1座：21の対立遺伝子、DPA1座：4の対立遺伝子。

これら対立遺伝子の多くは、血清学的分析を逃れ、DNAの点でのみ同定しうる。血清学的型別判定の限界は、DR4血清学的特異性により例示されうる。これは今は、DNA配列の点でのみ同定できる11のサブタイプ（DRB1*0401-0411）に細分される（J. G. ボドマー、S. G. E. マーシュ、E. D. アルバート、W. F. ボドマー、B. デュボン、H. A. アーリッヒ、B. マッハ、W. R. メイア、P. パラム、T. ササズキ、G. M. T. シュロイダー、J. L. ストロミンガー、A. スビガード及びP. I. テラサキ(1991) *Tissue Antigens* 37、97参照）

同様にいくつかの同種抗血清によりDRw13及びDRw14に細分されうるDRw6特異性は10の対立遺伝子配列（DRB1*1301-1305及びDRB1*1401-1405）を含み（上記のJ. G. ボドマーの文献参照）、これはまたDNA配列の点での遺伝子型分析によってのみ区別されうる。

遺伝子型分析は、クラスIIHLA系の多様性を遺伝子の点で直接に分析することを可能にする新しいアプローチで

ある。遺伝子型分析は分子ハイブリッド化の原理に基づいており、提案された最初のアプローチは、いわゆる「RFLP」法であり、これは制限酵素を用いてDNAを切断し、これら酵素により発生された特定のDNAフラグメントのサイズを分析することにある（C. T. ウェイク、E. O. ロング及びB. マッハ(1982) *Nature* 300、372 - J. ビーメ、M. アンダーソン、G. アンダーソン、E. ミラー、P. A. ペターソン及びL. ラスク(1985) *J. Immunol.* 135、2149 - J. L. ビドウェル、E. A. ビドウェル、D. A. ザベージ、D. ミドルトン、P. T. クロウダ及びB. A. プラトレイ(1988) *Transplantation* 45、640参照）。

RFLP分析は、血清学により検出できない対立遺伝子的差異のいくつかのみ

を認識することを可能にし、この方法はまだ制限がある。実際、異なる配列を持つ一つの対立遺伝子は、異なるヌクレオチドが分析に用いられた制限酵素の認識部位にある場合にのみ同定可能である。従って、多数のクラスIIHLA対立遺伝子がこの分析により認識されないであろう。また、RFLP分析は、コード配列における変更をまれにしか検出せず、変更の正確な性質について情報を与えない。最後に、この方法は、いくつかの制限酵素により消化されるべき比較的多量の核酸の使用、電気泳動及びフィルターへの移動を含むので、長たらく、冗長である。

RFLP法の限界を例示するために、DR1、DR4、

DRw 8、DRw 11又はDRw 13特異性のサブタイプがRFLPにより検出できないことが述べられる。

クラスIIHLAの遺伝子型分析の新しい方法が提案され、これは、「オリゴヌクレオチドによる型別判定」と呼ばれる方法である。[クラスIIHLA遺伝子、及び特に、はるかに最も多形性であるDR β 遺伝子のDNA配列の知識の結果、遺伝子の配列中の所与の場所に特異的なオリゴヌクレオチドが、ハイブリッド化による多形性の分析のためのトレーサーとして用いられうる。これらオリゴヌクレオチドは、出来るだけ最も情報を与えるよう、及び配列におけるそれらの差に基づいて異なる対立遺伝子の同定を可能にするように選ばれる。実際に、配列における何らかの差異、単一のヌクレオチドさえも検出されうる。

オリゴヌクレオチドによる型別判定の該手法は、アンゲリニら、Proc. Natl Acad. Sci. U S A Vol. 83、4489～4493頁(1986)に記載されるようにDNAに、及びRNAに等しく適用されうる(C. ウクラ、J. J. ファンロード、J. ゴルスキ及びB. マツハ(1987) J. Clin. Invest、80、1155参照)。

この新しいアプローチは、水素結合を介して相補的配列と相互作用し、それによって公知の対合の法則すなわちDNAにおけるA - T、G - CおよびRNAにおけるA - U、G - Cに従って安定なハイブリッドを形成する可能性がある核酸の特徴的性質を用いる分子ハイブリッド化の原理に基づく。すなわち、既知の対立遺伝子のDNA又はRNA

配列に対応する合成オリゴヌクレオチドがプローブとして、試料中の該プローブの配列に相補的な配列を含む標的核酸配列を同定するために用いられうる。標的とプローブの間で形成されたハイブリッドのラベリングは、試料中の標的の検出及び定量化を可能にする。このラベリングは、任意の公知のラベルたとえば酵素的、化学的又は放射性ラベルにより行われる。これら原理に基づいて、クラスII HLAのためのオリゴヌクレオチドによる型別判定の最初の適用は、いわゆるサザーン法を用いてアンゲリニらにより上記の文献中に示され、それによると標的DNAがナイロン膜上に沈着され、検出はラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを用いて行われる。該方法は次に、通常的血清学により同定できないクラスII HLA対立遺伝子の検出に適用された(J. M. チェルシー、J. ゴルスキ、M. ジャネット及びB. マッハ(1988) Proc. Natl. Acad. Sci, U S A 85、198 - J. M. チェルシー、J. ゴルスキ、H. ベツェル、A. C. フレイデル、L. ゲプアーラー、M. ジャネット及びB. マッハ(1989) Human Immunol. 24、1 参照)。クラスII HLA型別判定への別の直接的適用は、PCT特許出願WO 89/11547号に記載されるものであり、いわゆるドットブロット法を用いる。これら手法の変更は、いわゆる逆ドットブロット法により示され、これはヌクレオチドプローブを紙、ニトロセルロース又は両者の混合の膜に結合し、ハイブリッド化の検出をラベルされた標的により行うことにある。この手法は、HLA-DQA型別判

定及び地中海 β -タラセミアの突然変異の検出に適用された(R. K. サイキら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、Vol. 86、6230~6234頁(1989))。

上述したように、及び上記刊行物ならびに特許明細書に説明されているように、細胞型別判定は、ゲノムにおける点突然変異の検出を必要とし、単一ヌクレオチドに関する以外相同な配列を検出し、区別するのに十分に敏感であるプローブの開発を含む。また、良好な感度を保持しながら大きな特異性をテストに与える短いプローブ、一般に30未満のヌクレオチドのプローブを用いることが必要であることが見い出された。短いオリゴヌクレオチドの使用は、広いスペクトルの選択性を利用可能にすることを可能とする。

固体支持体へのプローブの結合を含むテストが用いられる場合、そのような固体支持体に30未満のヌクレオチドの短いプローブを固定化することに結びつく問題が残されている。R. K. サイキらは上記刊行物中で、15～20の塩基より成るプローブの3' 未満に400の塩基のポリ (dT) 尾をカップリングし、そして紫外線光に曝露してナイロン中に存在する第一アミンにチミン塩基を共有結合的に結合することによってナイロンフィルターに上記尾を介してプローブを固定化することより成る方法を提案した。

しかし、この方法は、完全に満足なものではない。なぜなら、それは特異性の問題を示すからである。事実、プローブのチミン塩基もまた、UV照射下で支持体と反応でき、それによりハイブリッド化の効率の減少をもたらす。

また、産業化の理由から、大きな特異性及び良好な感度を有し、しかしまた実施が簡単であり、迅速に実行され、安価であり、自動化でき、かつ個人の型別判定のために用いようとするところの型別判定法を開発することが望ましい。

今、個人のHLA-D R遺伝子型を決定するための新規方法が見い出され、これは、単一ヌクレオチドに関する以外相同である配列を検出しかつ区別することを可能にしながら、上記欠点を克服する。

本発明法は、最小数のプローブで型別判定を可能にするように選ばれた一組のヌクレオチドプローブを用いて行われる。このプローブの組は、特に、単一の温度、特に37℃で行うことを可能にする利点を持つ（但し、下記の実験の部から判るように他の温度で実施することも可能である）。そのような一組のプローブはまた、本発明の一部を成す。

下記で定義される本発明のプローブの組は、サザン形式の手法において（標準的トレーサー剤でラベルされた）検出プローブの形で、あるいは好ましくは固体支持体上に固定化された（サンドイッチ又は逆ドットブロット法）捕捉プローブの形で、直接にまたはリガンドを介して受身結合（吸着）によりたとえば疎水性リガンドにより（たとえばヨーロッパ特許出願第0,405,913号参照）、あるいは、ここでもまた直接に作られうるあるいは支持体に共有結合的に結合しうるリガンドを介して作られうる少くとも一つの共有結合の設立により（たとえばPC

T特許出願WO88/01,302号参照)用いられうる。プローブの固定化は、公

知法を用いて、又は後述の他の方法を用いて行われうる。

本発明のプローブ（ヌクレオチドプローブ）は、主にヌクレオチド配列の形で記述されるであろう。所与の温度で点突然変異を検出することを意図されるプローブの場合においてさえ、ハイブリッド化複合体の安定性に多かれ少なかれ好都合な溶液、緩衝液の使用によって特に、種々の長さ（ヌクレオチドの数）のプローブの使用をもくろむことがある程度可能であることが、当業者には明らかである。従って、本発明のプローブは、最大であると一般に考えられる（特に、もし比較的低い温度たとえば37℃での実施が望まれるなら）配列により定義され、かつ更に、該温度でなお使用可能でありかつ点突然変異にさえ感受性であるであろう最小の配列の表示を伴う。

夫々の特定のヌクレオチドプローブが、その対応する相補性プローブを有し、それは当然、捕捉又は検出プローブとして同じ役割を演じうることが当業者には明らかである。従って、本発明は、後述されるであろう配列に相補性の配列を持つプローブを包含する。

また、一組のプローブにおいて一般に、ある特定の特異性Xを認識する一つのプローブを、二つのプローブの系（その一つが特異性X及びYを認識し、他方が特異性X及びZを認識する）で置き代えうることを当業者には明らかである。この場合、XYプローブ及びXZプローブの両者による陽の応答は、特異性Xの存在を推論することを可能

にする。従って、本発明は、後述するように、一又は二以上のプローブが二つのプローブまたはいくつかのプローブの均等な系により置き換えられたプローブ系を包含する。当然に、そのような組合せ系は、2より多い多数の特異性に適用されうる。

本発明は、HLA DRタイプを決定するためにオリゴヌクレオチドでの型別判定法において用いられうるヌクレオチドプローブに関し、該プローブは下記のものから選択される：

- T G G C A G C T T A A G T T T
- C C T A A G A G G G A G T G
- G C G A G T G T G G A A C C T
- A A G A C A G G C G G G C .

直上の4つの配列は、夫々、引用番号101、102、103および104で呼ばれる。

プローブ101は、DRB1^{*}01タイプを同定することを可能にする。

プローブ102は、DRB1^{*}02タイプを同定することを可能にする。

プローブ103は、DRB4^{*}01タイプを同定することを可能にし、プローブ104は、DRB1^{*}1305タイプを同定するために有用である。

本発明はまた、プローブ101～104から選択された少なくとも1つのプローブを含む1セットのヌクレオチドプローブまたはHLAタイプキットに関する。

本発明はまた、下記より選択される少なくとも1つのプローブを更に含む、そのような1セットのヌクレオチドプローブに関する：

- G T G G A C A A C T A C T G
 - G A T A C T T C T A T C A C C A A
 - G C C T G A T G A G G A G T A C
 - T G G C A G G G T A A G T A T A A G
 - G G G C C C T G G T G G A C A
 - T G C G G T A T C T G C A C A
 - G G A G G A G G T T A A G T T
 - C T G G A A G A C G A G C G
 - T G G A A G A C A A G C G G
 - T G C G G A G C A C T G G A
 - A A C C A G G A G G A G A A C G T G
 - A C T C T A C G G G T G A G T G
 - G A C A C C T A T T G C A G A C

下線部分は、最小配列に対応する。

直上の13の配列は、夫々、引用番号105～117で呼ばれる。

好ましい実施態様において、プローブ111は、3'末端の下線を付されていない2つのTを含む完全な形で用いられる。その特異性は、プローブ45のそれと同じである。

プローブ115は好ましくは、下線を付された配列プラス5'末端の下線を付されていない2つのAの形で用いられる。その特異性は、プローブ28のそれと同じである。

プローブ105～110、112～114、116および117は好ましくは、下記の実験の部において引用番号43、9、10、14、17、44、46、48、47、24および27を付されているそれらのプローブの形で用いられる。

特に本発明は、上記で定義した1セットのプローブであって、それが更に下記のプローブ（下記部分は最適配列に対応する）の少なくとも1つを含む事実を特

徴とする1セットのプロープに関する：

- G A G G A G G A C T T G C G C T
 - T A C G G G G C T G T G G A G
 - G G A G C T G C G T A A G T
 - T T C C T G G A G A G A C A C
 - G G G A G A G A T A C T T C C .

直上の5つの配列は、夫々、引用番号118～122で呼ばれる。これら配列は、特に、配列番号42、42a、52、37および55を持つそれらプロープの形で用いられる。

上記の特定のプロープは、特に、捕捉プロープまたは検出プロープとして用いられる。それらは好ましくは、固体支持体上に固定化されたまたは固定化される捕捉プロープの形で用いられる。

本発明の主体はまた、オリゴヌクレオチドでの型別判定の標準的手法に従い個人のHLA-DR β 型別判定を行う方法において、上記のプロープの組のプロープの少なくとも一部が、逐次的に又は同時的に捕捉又は検出プロープとして用いられることを特徴とする方法である。

自動化された方法において、該プロープの組が用いられ

るであろう。他の場合には、それらを次々と用い、集められた情報が型別判定のために十分である時に方法を止めることができることが明白である。

従って、本発明の方法は、下記の工程を本質的に含む：

一個人のHLA-DR遺伝子の多形性領域を含む標的核酸の試料を、上記定義したプロープの組の少なくとも一部と、選択された特定の手法に従い接触させる、

一標的が該プロープの配列と十分に相補性である配列を含む場合にのみ、各プロープとのハイブリッド化が起るように予め決めた条件下で公知法に従いインキュベートする、そして

一用いられた各プローブとのハイブリッド化またはハイブリッド化の不存在を標準的検出手法に従い決定する。

集められた情報は次に、用いられたプローブ及びリストされたHLA-DRタイプ及び／又は関連するサブタイプの知識を考慮に入れて、予め設定した型別判定計画に従い型別を決定するために用いられる。この仕事は、型別判定計画、すなわち、実際には観察された陽応答（ハイブリッド化）に従い直接にタイプ及び／又はサブタイプを与える表の使用により単純化される。本発明のプローブの組のために、そのような表は下記の実験の部で与えられる（表6を見よ）。

本発明は特に、上記プローブが捕捉プローブとして用いられ、方法が下記の工程を含む事により区別されうところの上記方法に関する：

- (a) 各捕捉プローブを固体支持体上に固定化する、
- (b) 各固定化捕捉プローブを、少なくとも一つの標的核酸フラグメントを含む液体媒体と、プローブの配列と相補性の配列が標的中に存在するならばハイブリッド化を許す予め決めた条件下で接触させる、そして
- (c) 形成されるハイブリッドの存在を検出する。

当然に、本発明のプローブは、RNA標的フラグメント及びDNA標的フラグメントの両者を検出する。また、上記プローブとは別に、総ての適当なプローブ、特に実施例5で後述するプローブの一つを検出プローブとして用いることが明らかに可能である。

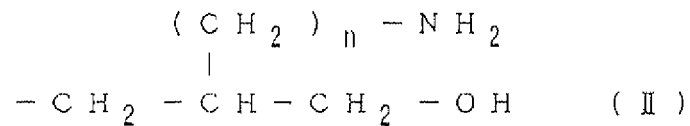
捕捉プローブが非常に短い、すなわち20のヌクレオチドより小さい、特に17のヌクレオチドより小さい場合、固体支持体へのプローブの結合を改善できる手段を用いることが必要になる。ならば、支持体へのプローブの結合は、固体支持体への結合を容易にするリガンドとプローブの共有結合的カップリングから生じる誘導体の形で行われる。リガンド（これは疎水性部分を含みうる）は特に、少なくとも一つの極性官能基たとえばアミノ基を含むリガンドである。該官能基は、共有結合の設立により固体支持体にプローブを結合すべく働きうる。極性官能基が支持体と反応しない場合、それは、たとえ支持体が疎水性であるとしても、支持体への吸着により結合を改善する。

リガンドはたとえば、夫々下記式 I 及び II により示される蛋白質及び化合物から選ばれる：



ここで Z は、2～12個の炭素原子を有し、非置換の又はヒドロキシル及び／又はアミノ基から選ばれた一以上の基により置換された、直鎖又は分枝したアルキルまたはアルケニル残基を示し、 M^+ は特にアルカリ金属またはアンモニウムイオンを示す。

このリガンドは好ましくは、捕捉プローブのヌクレオチド配列の 5' 末端に結合される。



ここで、n は 1～4 で変わりうる整数であり、好ましくは n = 1 又は 4 である。

このリガンドは好ましくは、捕捉プローブのヌクレオチド配列の 3' 末端に結合される。

リガンドが蛋白質である場合、たとえばアルブミン、好ましくはウシ血清アルブミンが選ばれ、これは捕捉プローブのヌクレオチド配列の 5' または 3' 末端に結合されうる。

本発明の支持体は、受身吸着又は共有結合によって、本

発明に従いヌクレオチド配列又は誘導体を固定化できる任意の支持であることができる。支持体は、通常用いられる任意の物質、たとえばニトロセルロース、ナイロン、紙又は好ましくは疎水性物質たとえばスチレンポリマーまたは少なくとも 10 重量% のスチレン単位を含む、スチレンに基づくコポリマーにより作られう

る。

本発明に従う固定支持体は、限定されないが、微小滴定プレート、シート、管、コーン、くぼみ等の形であることができる。

本発明の方法に従い、核酸を含む試料は、そのHLA-DR遺伝子型が決定されるべき個人から得られる。本発明の文脈において、HLA-DR核酸を含む任意のタイプの組織を用いる。すなわち、化学的、酵素的又は同様の手段による個人試料中に存在する核酸の開裂の後に得られる核酸(DNA又はRNA)フラグメントを用いることができる。

しかし、標的DNA又はRNAの増幅の前工程を入れると、本発明のオリゴヌクレオチドでの型別判定のための方法を容易にできる。配列特異的なオリゴヌクレオチドのハイブリッド化によるHLA多形性の分析の原理は同じままであるが、選択的増幅工程は標的の配列の富化を可能にし、それによって手法を単純化する(R. K. サイキ、T. L. プガワン、G. T. ホーン、K. B. ムリス及びH. A. アーリッヒ(1986) Nature 324、163-J. M. チェルシー、M. ジャネット及びB. マッハ(1990) Eur. J.

Immunol. 20,237)。

増幅は、DNAまたはRNAから得ることができる。試料中のHLA-DR標的の配列の増幅が、プローブへの核酸のハイブリッド化により標的の配列を検出することを可能にすべく十分な増幅を達成できる任意の公知法により実施されうることは、当業者に明らかである。

一般に、試料中の核酸はDNAであり、特にゲノムDNAであろう。しかし、本発明はまた他の核酸たとえばメッセンジャーRNA又はクローン化DNAを用いても実施でき、個人試料中の核酸は一重鎖又は二重鎖形であってもよい。もちろん、核酸が二重鎖形である場合、一重鎖核酸を得るために変性工程を行う必要がある。

本発明で用いられるプローブは、適当な条件下でその相補性配列に特異的に結合しうる配列特異的オリゴヌクレオチド(SSO)である。もし特定のプローブが対立遺伝子を一義的に同定するために用いられうるなら、プローブはASOす

なわち対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドと呼ばれる。単一のプローブが単独で、種々のDR β 対立遺伝子間の異なる性質の故にDR β 特異的対立遺伝子を同定できないことがありうる。

本発明の方法に従い、対立遺伝子の同定は、一組のプローブの結合のモデルから演繹され、ここで一組のプローブの個々のプローブはHLA-DR遺伝子の異なる部分に特異的である。既知の対立遺伝子のDNA配列に対応する多数のプローブの選択の結果として、本発明のオリゴヌク

レオチドによる型別判定法の特異性は、DRB1、DRB3及びDRB5座の総ての対立遺伝子を同定することを可能にする。もちろん、本発明の方法は、曲の極端に多形性の座、たとえばDQB1及びDPB1の対立遺伝子を同定するために用いうる。対立遺伝子的差異は本質的に、HLA分子の初めのドメインをコードするエキソン(aa5-94)中に局在するので、プローブはこの領域中に局在する特定の配列に相補性であるように選択される。新しい対立遺伝子が発見されるかも知れない場合には、それはクラスIIHLA配列の登録に直ちにリストされ、これは、情報を与えるトレーサーのコレクションを更新し、従って方法論を何らかの新しい対立遺伝子の検出に適合させることを可能にする。

完全なクラスIIHLA型別判定を合理化するために、初めに、主なHLA-DR特異性すなわちHLA-DR1-DRw18に限られた数のプローブで認識しうる包括的なDR型別判定の第一工程を導入することが提案されている。この工程は、多数の臨床適用のために十分である(B. マッハ及びJ. M. チェルシー(1991) Human Immunol. 30、278参照)。

この第一工程の結果に基づいて、DQB1多形性を検出し、そしてもし必要ならDPB1対立遺伝子の特徴づけるために、第二段階でDR β マイクロ多形性を作るのに必要な特異的なプローブを選択することができる。

オリゴヌクレオチドによる型別判定の手法によるHLA

-DR1-DRw18の分析は、DR血清学に代って常用のDR型別判定のための組織適合性テストにおいて、特に、腎臓移植の待機リストに乗っている患者のD

R型別判定、可能性ある腎臓提供者の型別判定、骨髄移植が意図される白血病患者ならびにその家族又は非血縁の可能性ある提供者のDR型別判定、骨髄提供ボランティアの登録の編集のための大規模なDR型別判定を行うために、たとえばインスリン依存性糖尿病の場合に疾病とHLA系の間の関係を調べるために、予防的医薬での利用のために、あるいは父親及び他の法医学的特定のためのテストのために用いることができる。

本明細書で用いられる言葉のいくつかの定義を下記に示す。

「遺伝子型」は、個人の遺伝子型の特徴のセット（組）を言い、遺伝子の表現産生物とくに蛋白質の分析から明らかになる個人の特徴である「表現型」の対語である。

「対立遺伝子」は、核酸配列において相異を示す同じ遺伝子の異なる選択形である。これら相異は、DNA、RNA及び蛋白質に、おいて現われる。

「多形性」は、同じ遺伝子に関し異なる対立遺伝子の存在により個体群中に導入される多様性を特徴づける。

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書において、プライマー、プローブ及び検出されるべき核酸フラグメントなどを指す。オリゴヌクレオチドは、任意の公知の適当な方法で調製されうる。

「ヌクレオチドプローブ」は、天然のDNA又はRNAフラグメントまたは天然あるいは合成のオリゴヌクレオチド、又は合成のDNA又はRNAフラグメントを表わし、未修飾であるか、あるいは一以上の修飾塩基たとえばイノシン（文字Iで示される）、5-メチルデオキシシチジン、5-（ジメチルアミノ）-デオキシウリジン、デオキシウリジン、2,6-ジアミノプリン、5-ブロモデオキシウリジンまたはハイブリッド化を許す任意の他の修飾塩基を含む。

また、本明細書において捕捉プローブの配列がアンダーラインを付されている場合には、これは本発明に従う型別判定のための最適配列を表わす。当然に、これら最適配列は、少なくとも一つの塩基により3'及び／又は5'末端で延長されうる。この場合、任意的に追加されうるいくつかの塩基は、たとえば下記の文から判るように、カッコ内に示される。最後に、使用される配列の長さを、実施

条件（たとえばハイブリッド化及び洗滌の温度、ハイブリッド化及び又は洗滌緩衝液の性質）及び型別判定計画に従って変更することは、当業者にとって可能である。

本発明のより良い理解は、本発明の方法の好ましい実施態様を示す非限定的な実施例に言及して書かれた以下の詳細な説明を読むことによって得られるであろう。

実施例 1

本発明で用いられ、ここで例として示されるリガンドは、下記の表 1 に示すように市販入手可能な化合物でありうる。

表 1

リガンド	式	供給者	参照
a	$\text{CF}_3\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{OP} \begin{array}{l} \text{OCH}_3 \\ \text{N}(\text{isoPr})_2 \end{array}$	アプライド バイオシステム	400808
b	$\text{MMTrNH}(\text{CH}_2)_{12}\text{OP} \begin{array}{l} \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CN} \\ \text{N}(\text{isoPr})_2 \end{array}$	クロンテック ラボ社	5206-1
c	$\text{MMTrNH}(\text{CH}_2)_3\text{OP} \begin{array}{l} \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CN} \\ \text{N}(\text{isoPr})_2 \end{array}$	グレンリサーチ	10-1903
d	$\begin{array}{c} \text{FmocNHCH}_2\text{CHCH}_2\text{ODMT} \\ \\ \text{OP} \begin{array}{l} \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CN} \\ \text{N}(\text{isoPr})_2 \end{array} \end{array}$	クロンテック ラボ社	5203-3
e	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NH Fmoc} \\ \\ \text{CPGLCAA-O-CH}_2\text{CH-CH}_2\text{ODMT} \\ \\ (\text{CH}_2)_4\text{NH Fmoc} \\ \\ \text{CPGLCAA-O-CH}_2\text{CH-CH}_2\text{ODMT} \end{array}$	クロンテック ラボ社	5221-1
f	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NH Fmoc} \\ \\ \text{CPGLCAA-O-CH}_2\text{CH-CH}_2\text{ODMT} \\ \\ (\text{CH}_2)_4\text{NH Fmoc} \\ \\ \text{CPGLCAA-O-CH}_2\text{CH-CH}_2\text{ODMT} \end{array}$	クロンテック ラボ社	5222-1
f MMTr = モノメトキシトリチル DMT = ジメトキシトリチル Fmoc = 9-フルオレニルメトキシカルボニル CPG = 制御された孔のガラスビーズ LCAA = 長鎖アルキルアミン (スパーサーアーム)			

オリゴヌクレオチドへのホスホルアミダイトリガンドのカップリングは、下記の一般的なプロトコールに従って行われる。

アプライド バイオシステムズ社の自動装置381Aで、該製造者のプロトコール

ルに従うホスホルアミダイト化学を用いてオリゴヌクレオチドが合成される。0.2Mの濃度で無水アセトニトリルに溶解されたホスホルアミダイトリガンドが合成装置の位置Xに置かれ、リガンドの付加は、オリゴヌクレオチドの合成が完了した時に自動合成の標準プロトコールに従いオリゴヌクレオチドの5'末端で起る。

リガンドがジメトキシトリチル保護基を有する場合、たとえば化合物dの場合には、合成の最後にトリクロル酢酸でトリチル基を脱保護する追加的工程を行うことが必要である。

33% NH_4OH 中で55℃での一夜の脱保護及び続く-20℃でエタノール中での析出の後に、オリゴヌクレオチドは真空乾燥され、1mlの水に溶解される。

化合物b及びcの場合、モノメトキシトリチル基の開裂の追加的工程が、脱保護の後に製造者（夫々、クロンテック及びグレンリサーチ）のプロトコールに従って行われる。

化合物e及びfの場合、自動合成は、標準プロトコールに従いリガンドをグラフトされたシリカから始まる。リガンドとオリゴヌクレオチドとのカップリングは、後者の3'末端を介して起る。

総ての場合に、5'又は3'末端で修飾されたオリゴヌ

クレオチドが、ブラウンリー RP18カラム（10mm×25cm）上で逆相高压液体クロマトグラフィ（HPLC）により精製される。

条件：流速、4.6ml/分

勾配、30分間の経過中に緩衝液Bの10%～35%。

3分間の経過中に緩衝液bの35%～100%。

緩衝液A及びBの特徴は下記の通りである。

緩衝液A：0.1モル濃度トリエチルアンモニウム アセ

テート（TEAA）、pH7.00

緩衝液B：50%緩衝液A+50% CH_3CN 。

実施例2

ウシ血清アルブミン（BSA）へのオリゴヌクレオチドのカップリング。

アミノリンクの2アームを有し、表1で記号aを付されたオリゴヌクレオチドが実施例1記載のように合成される： 3×10^{-8} モルのオリゴヌクレオチドが真空乾燥され、0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液pH9.3の25 μ lに溶解される。DMF中に30mg/mlのDITC（1, 4 - フェニレンジイソチオシアネート、Fluka78480）を含む溶液500 μ lを加える。水3mlを加える前に、この混合物を室温で1.5時間攪拌する。溶液をブタノール（3 \times 3ml）で抽出後に、残った水性相（500 μ l）を真空乾燥し、次にホウ酸塩緩衝液（0.1M、pH 9.3）400 μ l中のBSA（Pierce 30444）の 1×10^{-7} モル（6.6mg）で溶解する。室温で一夜攪拌後に、接合体をNaCl勾配（表1）を有するAX300カラ

ム（BOWNL E E 4.6 \times 100 mm）でHPLCを用いてイオン交換により精製する。接合体ピークは水（2 \times 1リットル）に対して透析され、真空下で濃縮され、1mlの水で溶解され、-20 $^{\circ}$ Cで貯蔵される。

クロマトグラフ条件：

勾配：25分間の経過中に15% B' ~56% B'。

2分間の経過中に56% B' ~100% B'。

緩衝液A' 及びB' の特徴は下記の通りである。

緩衝液A'：20mMリン酸ナトリウム、pH7.00；20%

CH₃CN。

緩衝液B'：緩衝液A' + 1M NaCl又は

2M NaCl。

実施例3

表2は、選択された一致配列（DR CONSと呼ぶ）に相対的な突然変異されたアミノ酸の位置を定義する目的をもってDR β 遺伝子の種々の対立遺伝子についてのアミノ酸配置を示す。これら突然変異は、DNAにおける不顕ではない突然変異、すなわちアミノ酸における変化を起すであろう突然変異に対応する。実際に、アミノ酸は、塩基の三連符によりDNA中でエンコードされていると知られている。第三位置での突然変異は一般に、アミノ酸における変化をもたらさないであろう。対照的に、第二塩基における変化は、極めてしばしばアミノ酸にお

ける変化を起す。最後に、第一塩基での突然変異は常に、アミノ酸の修飾をもたらすであろう。

種々の対立遺伝子の型別判定の場合に、非不顕突然変異に対応するDNA上の突然変異が従って、最もしばしば用いられる。しかし、不顕タイプの突然変異を、たとえば2つの極めて密接に関係する対立遺伝子を区別する目的で検出することが可能である。

表3は、今日まで既知の及び刊行物に発表された総ての対立遺伝子に関しDR β 遺伝子のヌクレオチドの配置を、表2におけると同じ一致配列に相対的に示す。

組織適合性についての第5回会議（オランダ、ライデン、1991）で提案された表記法が、種々の対立遺伝子を指名するために用いられる。表2中のカッコ内の指名は、従来を表記を示す。

表 2

DR CONS	10	20	30	40	50	60	70	80	90
	PRFLEQXKSECHFNCTERVRLDQYFNQEEYVRDSVGYRAVTELGKRPDAEYWN SQXQLLEQRRAAVDTCYCRHNYGVGESFTVQRR								
DRB1*0101 (Dw1)	W-L-F		L-E-CI	S					
DRB1*0102 (Dw20)	W-L-F		L-E-CI	S					AV
DRB1*0103 (DwBON)	W-L-F		L-E-CI	S			I-DE		
DRB1*1501 (Dw2)	W-P-R			S	F		I-A		V
DRB1*1502 (Dw12)	W-P-R			S	F		I-A		
DRB1*1601 (Dw21)	W-P-R			S			F-D		
DRB1*1602 (Dw22)	W-P-R			S			L-D		
DRB1*0301 (Dw17)	YST		Y-H-N		F		K-CR-N		V
DRB1*0302 (Dw18)	YST		E-H-N				K-CR-N		
DRB1*0401 (Dw4)	V-H		H				K		
DRB1*0402 (Dw10)	V-H		H				I-DE		V
DRB1*0403 (Dw13TAS)	V-H		H				E		V
DRB1*0404 (Dw14)	V-H		H						V
DRB1*0405 (Dw15)	V-H		H		S				
DRB1*0406 (KT2)	V-H		H-S				E		V
DRB1*0407 (Dw13JHA)	V-H		H				E		
DRB1*0408	V-H		H			S			
DRB1*0409	V-H		H				X		V
DRB1*0410	V-H		H			S			V
DRB1*0411	V-H		H			S			V
DRB1*0701 (Dw17)	W-G-YK		Q-E-L	F		V-S	I-D-GQ		V
DRB1*0702 (DB1)	W-G-YK		Q-E-L	F		V-S	I-D-GQ		V
DRB1*0801 (MADURA)	YSTG-Y					S	F-D-L		
DRB1*0802 (SPL)	YSTG-Y					S	F-D-L		
DRB1*0803 (TAB)	YSTG-Y					S	I-D-L		V
DRB1*0804	YSTG-Y						F-D-L		
DRB1*0901 (Dw23)			Y-H-GI	N		V-S	F-R-E		V
DRB1*1001	EV-F		L-E-RVH	A-Y			R		
DRB1*1101 (SVEIG)	YST						F-D		
DRB1*1102 (JUN)	YST					E	I-DE		V

表 2 (続き)

DR CONS	10	20	30	40	50	60	70	80	90
	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	PRFLEQXKSECHFFNGTFRVFLDRYFANOEYVRFQSDVGEYRAVTELGRRPDAEYWNSSQKOLLEQRAAVDTYCRHNYGVGSEFTVQRR								
DRB1*1103 (UA-S2)	---	YST-	---	---	---	E-	---	F--DE-	---
DRB1*1104 (TUBO)	---	YST-	---	---	---	E-	---	F--D-	---
DRB1*1201 (HERLOP)	---	YSTG--Y-	---	---	---	V--S-	---	I--D-	---
DRB1*1202	---	YSTG--Y-	---	---	---	V--S-	---	F--D-	---
DRB1*1301 (HHK)	---	YST-	---	---	---	N-	---	I--DE-	---
DRB1*1302 (WT46)	---	YST-	---	---	---	N-	---	I--DE-	---
DRB1*1303 (HAG)	---	YST-	---	---	---	S-	---	I--DK-	---
DRB1*1304	---	YST-	---	---	---	S-	---	I--DE-	---
DRB1*1305 (DES.DI)	---	YST-	---	---	---	N-	---	F--D-	---
DRB1*1401 (TEM)	---	YST-	---	---	---	F-	---	R--E-	---
DRB1*1402 (AMALA)	---	YST-	---	---	---	N-	---	D--L-	---
DRB1*1403 (JX6)	---	YST-	---	---	---	N-	---	R--E-	---
DRB1*1404	---	YSTC-	---	---	---	F-	---	R--E-	---
DRB1*1405	---	YST--Q-	---	---	---	F-	---	R--E-	---
DRB3*0101 (52a)	---	LR-	---	---	---	V--S-	---	K--GR--N-	---
DRB3*0201 (52b1)	---	LL-	---	---	---	R-	---	K--GQ--N-	---
DRB3*0202 (52b2)	---	LL-	---	---	---	R-	---	K--GQ--N-	---
DRB3*0301 (52c)	---	LL-	---	---	---	V--S-	---	K--GQ--N-	---
DRB4*0101	---	A--C-	---	---	---	A--YN--L--Q-	---	R--E-	---
DRB5*0101 (DW2)	---	Q--D--Y-	---	---	---	DL-	---	F--D-	---
DRB5*0102 (DW12)	---	Q--D--Y-	---	---	---	N-	---	F--D-	---
DRB5*0201 (DW21)	---	Q--D--Y-	---	---	---	N-	---	I--A-	---
DRB5*0202 (DW22)	---	Q--D--Y-	---	---	---	N-	---	I--A-	---

表 3

	10	15	20	25	30	35	40	45
DR cons	R F L E O X K S E C H F F N G T E R V R F L O R Y F Y H O E E Y V R F O S O V G E Y R A							
DRB1*0101	CACGTTCTGGGAGCAGATACGTCTGACATGTCATTTCTTCATATCGGACGCGGCGGCTGCGCTTCTGGACACATCTTCTTAACACGACGACGTACGTCGCCCTTCGACACGACGCTGGCGGAGTACCGGCGG							
DRB1*0201	-----T-CG-----							
DRB1*0301	-----T-CT-----							
DRB1*0301	-----T-CT-----							
DRB1*0301	-----T-CTC-----							
DRB1*0302	-----T-CTC-----							
DRB1*1101	-----T-CTC-----							
DRB1*1102	-----T-CTC-----							
DRB1*1103	-----T-CTC-----							
DRB1*1104	-----T-CTC-----							
DRB1*1201	-----T-CTC-----							
DRB1*1202	-----T-CTC-----							
DRB1*1301	-----T-CTC-----							
DRB1*1302	-----T-CTC-----							
DRB1*1303	-----T-CTC-----							
DRB1*1304	-----T-CTC-----							
DRB1*1305	-----T-CTC-----							
DRB1*1401	-----T-CTC-----							
DRB1*1402	-----T-CTC-----							
DRB1*1403	-----T-CTC-----							
DRB1*1404	-----T-CTC-----							
DRB1*1405	-----T-CTC-----							
DRB1*0801	-----T-CTC-----							
DRB1*0802	-----T-CTC-----							
DRB1*0803	-----T-CTC-----							
DRB1*0804	-----T-CTC-----							
DRB1*04	-----GT-----							
DRB1*0406	-----GT-----							
DRB1*0101	-----GC-----							
DRB1*01	-----C-----							
DRB1*0901	-----C-----							
DRB1*1001	-----C-----							
DRB1*0101	-----C-----							
DRB1*0102	-----C-----							
DRB1*0103	-----C-----							
DRB1*0101	-----C-----							
DRB1*0102	-----C-----							
DRB1*0103	-----C-----							
DRB1*0104	-----C-----							
DRB1*0105	-----C-----							
DRB1*0106	-----C-----							
DRB1*0107	-----C-----							
DRB1*0108	-----C-----							
DRB1*0109	-----C-----							
DRB1*0110	-----C-----							
DRB1*0111	-----C-----							
DRB1*0112	-----C-----							
DRB1*0113	-----C-----							
DRB1*0114	-----C-----							
DRB1*0115	-----C-----							
DRB1*0116	-----C-----							
DRB1*0117	-----C-----							
DRB1*0118	-----C-----							
DRB1*0119	-----C-----							
DRB1*0120	-----C-----							
DRB1*0121	-----C-----							
DRB1*0122	-----C-----							
DRB1*0123	-----C-----							
DRB1*0124	-----C-----							
DRB1*0125	-----C-----							
DRB1*0126	-----C-----							
DRB1*0127	-----C-----							
DRB1*0128	-----C-----							
DRB1*0129	-----C-----							
DRB1*0130	-----C-----							
DRB1*0131	-----C-----							
DRB1*0132	-----C-----							
DRB1*0133	-----C-----							
DRB1*0134	-----C-----							
DRB1*0135	-----C-----							
DRB1*0136	-----C-----							
DRB1*0137	-----C-----							
DRB1*0138	-----C-----							
DRB1*0139	-----C-----							
DRB1*0140	-----C-----							
DRB1*0141	-----C-----							
DRB1*0142	-----C-----							
DRB1*0143	-----C-----							
DRB1*0144	-----C-----							
DRB1*0145	-----C-----							
DRB1*0146	-----C-----							
DRB1*0147	-----C-----							
DRB1*0148	-----C-----							
DRB1*0149	-----C-----							
DRB1*0150	-----C-----							
DRB1*0151	-----C-----							
DRB1*0152	-----C-----							
DRB1*0153	-----C-----							
DRB1*0154	-----C-----							
DRB1*0155	-----C-----							
DRB1*0156	-----C-----							
DRB1*0157	-----C-----							
DRB1*0158	-----C-----							
DRB1*0159	-----C-----							
DRB1*0160	-----C-----							
DRB1*0161	-----C-----							
DRB1*0162	-----C-----							

B S Aにカップリングされたオリゴヌクレオチドが合成された。

表 4

参照	No.	5' - 3' 配列 ***	リガンドX	tr **
1	563	CTGGAAAGATGCA	a	17.11
2	562	TGGAAAGATGCAT	a	17.63
3	561	CAGGATAAGTATGA	a	17.52
4	579	GCAGGATAAGTATGA	a	16.7
5	603	CAGCAGGATAAGTATG	b	17.44
6	1094	CAGCAGGATAAGTATG	a	16.25
7	546	TGGACAACACTACTG	a	18.61
7a	570	GGACAACACTACTG	a	16.09
8	596	GGACAACACTACTG	b	17.29
9	545	GATACTTCTATCACC	a	19.2
10	398	CCTGATGAGGAGTA	a	14.5
11	573	CAGGGTAAGTATAAG	a	16.18
12	580	CCAGGGTAAGTATAAG	a	16.99
13	1064	TGGCAGGGTAAGTAT	a	17.55
14	591	GGCAGGGTAAGTATAAG	b	18.18
15	1095	GGCAGGGTAAGTATAAG	a	17.13
16	400	GGCCCTGGTGGA	a	13.79
17	595	GGCCCTGGTGGA	b	17.43
18	574	GCGGTATCTGCACA	a	16.62
19	556	GGACGAGGTTAAG	a	17.94
20	555	TGGAAGACGAGC	a	15.1
21	755	TGCGGAGCACTGGA	a	16.85
22	867	GGAGACAAAGCG	a	13.36

表 4 (続 き)

23	915	CTCTACGGGTGAG	a	19.04
24	1066	CTCTACGGGTGAGT	a	17.14
25	990	CACCTATTGCAGA	a	17.47
26	1067	CACCTATTGCACAC	a	17.08
27	1068	ACACCTATTGCAGA	a	17.81
28	802	CCAGGAGGAGAACGT	a	15.86
29	1096	CCAGGAGGAGAACGT	c	15.77
30	1097	CCAGGAGGAGAACGT	d	13.74
31	1098	CCAGGAGGAGAACGT	e	14.03
32	1099	CCAGGAGGAGAACGT	f	14.81
33	1100	CCAGIAGGAGAACGT	a	14.97
34	1107	ACCAGIAGGAGAACGT	a	16.05
34a	1127	AACCAGIAGGAGAACGT	a	16.62
35	935	ACCAGGAGGAGAACGTG	-	19.29
36	997	GAGCTGCCTAAG	a	16.55
37	1033	TTCCTGGAGAGAC	a	18.4
38	1030	TTCCTGGAGAGATAC	a	18.39
39	1065	TCCTGGAGAGATACT	a	18.01
40	1058	GGAGGACTTGCGC	a	17.9
41	1059	GGAGGACTTGCGCT	a	18.35
42	1060	ACGAGGACTTGCGC	a	17.05
42a	1061	ACGGGGCTGTGGA	a	16.79

- * Xは、表1で先に用いた命名法に従うリガンドを示す。
- ** Tr は、実施例1で記載した条件（BROWNLEE RP18カラム（4.6 mm×25cm）、流速1 ml／分）下でのHPLCにおけるオリゴヌクレオチドの保持時間（分単位）を示す。
- *** 配列33、34、及び34aにおける文字Iは、イノシンを示す。

表 5

参照	No	5' - 3' 配列	TR *	オリゴ/ BSA比**
43	571B	TGGACAACACTACT	7.85 (2M)	1
44	574B	GCGGTATCTGCACA	8.69 (2M)	0.8
45	556B	GGAGGAGGTTAAG	7.76 (2M)	1
46	555B	TGGAAGACGAGC	16.85 (1M)	0.8
47	756B	GCGGAGCACTGG	17.78 (1M)	1.5
48	867B	GGAAAGCAAGCG	16.65 (1M)	1.1
49	868B	TGGAAGACAAGC	8.56 (2M)	1.3
50	856B	GAGGAGCTCCTGCGCT	19.96 (1M)	1.2
51	966B	AGGAGAACGTGC	19.66 (1M)	1.5
52	997B	GAOCTGCGTAAG	18.88 (1M)	0.9
53	998B	AGCTGCGTAAGT	16.32 (1M)	1
54	1026B	GACAGACACTTCC	13.98 (1M)	0.5
55	986B	GGAGAGATACTTC	15.81 (1M)	0.6
56	1049B	GAGAGATACTTCC	15.86 (1M)	1.2
57	1089B	ACGGGGCTGTG	17.72 (1M)	1.1
58	1090B	TACGGGGCTGT	17.24 (1M)	1
59	1091B	CGGGGCTGTGG	17.42 (1M)	1.1

* Tr は、実施例2に記載した条件下でのHPLCにおける、BSAにカップリングされたオリゴヌクレオチドの保持時間(分単位)を示す。

(1M)は、緩衝液Bが1M NaClを含むことを意味する。

(2M)は、緩衝液Bが2M NaClを含むことを意味する。

** オリゴヌクレオチドは、アプライド バイオシステムズ社のプロトコールに従い260 nmにおける吸光度を測定し、UV分光法によりピコモル単位で定量される。BSAは、ブラトフォードの方法(ブラトフォード M. M.、Anal. Biochem., 72, 248(1976))に従ってピコモル単位でアッセイされる。オリゴ/BSA比は、これら2つの値の比である。

この実施例において、リガンドなしで、又はリガンドを用いて、あるいはたとえばBSAへカップリングして合成されることが出来る捕捉オリゴヌクレオチドが定義された。合成されるオリゴヌクレオチドの配列の選択は、実施例3の表3に記載される種々の対立遺伝子のDNA配列の配置(アラインメント)を考慮する。選択され、たとえば捕捉プローブとして用いられるオリゴヌクレオチドは、表6に記載のように型別判定計画を立てることを可能にする。他の型別判定計画が別のオリゴヌクレオチドを用いて規定されうることが当業者には全く明らかである。

表6において、カッコの間の指名は、DRB5対立遺伝

子のサブタイプのために、組織適合についての会議(1991)の以前に用いられた命名法を示す。

記号+は、表6中の問題の系統のサブタイプが対応する欄中のプローブとハイブリッド化を与えることを意味する。

表6を用いて、種々のプローブで得られた結果（ハイブリッド化またはハイブリッド化の欠如）を簡便に解釈できる。たとえば、プローブ43、14、28及び37との陽の応答を与える標的は、タイプ D R B 1 *0301 / D R B 1 *07に相当する。

表 6

プローブ 型	1	5	43	9	10	14	17	44	45	46	48	47	28	24	27	52	37	55	42	42a
DRB1*0101	+																			+
DRB1*0102	+																			
DRB1*0103	+									+									+	
DRB5*0101		+																		
DRB5*0102		+																		
DRB5*0201/0202		+																		+
DRB1*0301			+										+			+	+	+		
DRB1*0302			+										+			+		+		
DRB1*0401-0412				+						+										
DRB1*0402				+							+									
DRB1*1101/1104					+												+			
DRB1*1102/1103					+												+			
DRB1*1201/1202														+		+	+			+
DRB1*1301													+			+	+	+		
DRB1*1302											+		+					+		
DRB1*1303											+					+	+			
DRB1*1304										+							+			
DRB1*1305													+				+			
DRB1*1401												+						+		
DRB1*1402													+			+		+		
DRB1*1403							+						+			+		+		
DRB1*1404														+			+			
DRB1*1405																	+			
DRB1*0701/0702						+														
DRB1*0801-0804							+							+						
DRB1*0901																				
DRB1*1001																				

実施例5：検出プローブの調製

実施例2に従い、活性化され真空乾燥されたオリゴヌクレオチドが、0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液pH9.3の200 μ l中のホースラディッシュ パーオキシダーゼ（ベーリンガー マンハイム 413470）の 1.25×10^{-7} モル（5mg）に溶解される。

精製プロトコールは同じである：接合体は、50mM Tris-HCl緩衝液pH7.0、40%グリセロール中で-20°Cで貯蔵される。

表7は、HLA-D R検出のために用いられた種々の接合体をまとめて示す。

表 7

参照	5' - 3' 配列 ***	TR*	オリゴ/ HRP比 **
D1	CCGGGCGGTGAC(GT)GAGCTGGGGC	11.88(2M)	1.4
D2	CCGGGCGGTGACIGAGCTGGGGC	18.09(2M)	1.8
D3	GAACAGCCAGAAGGAC	9.32(2M)	1

* TR は、実施例2記載の条件下でのHPLCにおける、ホースラディッシュ パーオキシダーゼ（HRP）にカップリングされたオリゴヌクレオチドの保持時間（分単位）を示す。（2M）は、緩衝液Bが2M NaClを含むことを意味する。

** オリゴヌクレオチドは、アプライド バイオシステムズのプロトコールに従って260 nmで吸光度を測定

するUV分光光学によってピコモル単位で定量される。

ホースラディッシュ パーオキシダーゼ (HRP) は、
アトル M. A., J. Biol. Chem., 31, 14954 (1987) に従い UV で 402 nm でピコモル単位でアッセイされる。オリゴ/HRP 比はこの 2 つの値の比である。

*** 配列 D 2 中の文字 I はイノシンを示す。配列 D 1 において (GT) は、この位置で二つの塩基 G と T の等モル混合物があることを示す。

実施例 6：遺伝子物質の調製

全血からの核酸の抽出は、下記のプロトコールに従いアプライド バイオシステムズの装置で行われる：2～6 ml の全血を TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH8.00, 1mM EDTA) (6 ml のために十分な量の) 中に溶解し、30ml 抽出ロートに入れる。蛋白質分解酵素 K の溶液 (20mM Tris-HCl, pH8.5 中の 840 単位) を加える。全体を攪拌下に 55℃ で 1 時間インキュベートする。存在する過剰の蛋白質を、フェノール/クロロホルム混合物での 2 回の同時的抽出 (8.5ml) により除去する。全体を 60℃ で 20 分間攪拌する。有機相の除去後に、更にフェノール抽出を行う。過剰のフェノールを、クロロホルム (9.5ml) による 37℃ で 10 分間の抽出により除去する。水性相中の DNA 含量は、3 M 酢酸ナトリウム pH5.5 の 0.5ml 及びイソプロパノール 13.5ml を加えることにより析出され、次にフィルター上で回収される。次に DNA は、1 ml の蒸留水中に取り上げられ、その後、260nm で分光光学により

アッセイされる。

実施例 7：DNA の増幅

酵素的増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 手法 (ムリスとファローナ、Meth, in Enzymol. vol. 155, 335～350 頁) により下記のプロトコールに従って行われる：

下記の緩衝液の合計 100 μ l 中の精製された又はされない DNA の 0.1～2 μ g を

、エッペンドルフ型管に入れる：

- 10倍濃度のPCR緩衝液（500mM KCl、100mM Tris-HCl、pH8.3（20℃）、15mM MgCl₂、0.1%ゼラチン）の10μl、
- 0.5μM dNTP（dATP、dCTD、dGTP、TTP）の2μl、
- 25ピコモルに対応する各プライマーの2μl、
- Taq ポリメラーゼ（パーキン エルマー セタス）の1.5単位、
- 蒸留水（100μlとするのに十分な量）、
- パラフィン油の50μl。

該管をサーモサイクラー（パーキン エルマー セタス）中に置き、その中で下記の35回の温度サイクルが行われる。

- 95℃での変性の0.5分間、
- 55℃でのハイブリッド化の0.5分間、
- 72℃での延長化の0.5分間。

用いたプライマーは、下記の配列を持つ。

プライマー1 = 5' - CCGGATCCTTCGTGT

CCCCACAGCACG - 3'

プライマー2 = 5' - TCGCCGCTGCACTGTGAAG - 3'

実施例8

3×PBS（0.45M NaCl、0.15M リン酸ナトリウム、pH7.0）中の0.15μMの濃度の所与のDR特異性の捕捉オリゴヌクレオチドの溶液100μlを、ポリスチレン微小滴定プレート（Nunc 439454）のくぼみ中に置く。充填されたくぼみの数は、型別判定のために必要な数に等しい。

総ての場合に、増幅工程及び検出工程の有効性をチェックするために、正の対照が加えられなければならない。正の対照として用いられる捕捉プローブは、今日知られる総ての対立遺伝子上に存在し、下記の配列を持つ。

5' - GGGGAGTACCGGGCGGTGACGGAGCTGGGGCG
G C C T - 3'

プレートは、PBS/Tween（0.15M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム、

pH7.0; 0.5% Tween20(Merck 822184)) の300 μ lで3回洗われる。実施例7で記載されるような増幅生成物(100 μ l)が、2N NaOHの2 μ lにより室温で攪拌下で5分間変性される。10 μ lの2N酢酸、そして次に $n \times 50 \mu$ l (n は型別判定のために必要な捕捉プローブの数である)に等しい体積のPEG緩衝液(0.1M リン酸ナトリウム、pH7.0、0.5M NaCl、0.65% Tween 20、0.14mg/ml サケ精子DNA (Sigma D 9156)、2% PEG 4000(Merck 807490))

が順次、上記溶液に加えられる。この溶液50 μ lを各くぼみに配り、次にPEG緩衝液中の15nMの濃度の検出プローブ(オリゴヌクレオチド-パーオキシダーゼ接合体)の50 μ lを配る。プレートを37°Cで1時間インキュベートし、PBS/Tweenの3 \times 300 μ lで洗う。濃度4 mg/mlでOPD緩衝液(0.05M クエン酸、0.1M Na_2HPO_4 、pH4.93)中のOPD培質(オルトフェニレンジアミン、ケンブリッジ メディカル バイオテクノロジー 参照456)の100 μ lに、使用直前に1/1000希釈の30体積の H_2O_2 を加えたものを、くぼみごとに加える。20分間の反応後に、酵素活性を1N H_2SO_4 の100 μ lでブロックし、そして492nmでAxia マイクロリーダー(ビオ メリウ)を用いて読みを行う。

実施例9

実施例6に記載された方法に従って作られた6つのDNAが、実施例7記載の方法に従って増幅される。

型別判定プロトコルは、下記の捕捉プローブを含む：

5' a - G A T A C T T C T A T C A C C 3' = 5' 末端にリガンドを有する特異性DR3のオリゴヌクレオチド(参照番号 545)

5' G A T A C T T C T A T C A C C 3' = 同じ配列であるが、リガンドを有さないオリゴヌクレオチド(参照番号545 nu)

5' a - T G G A C A A C T A C T G 3' = 5' 末端にリガンドを有する特異性DR4のオリゴヌクレオチド(参

照番号 546)

5' TGGACAAC TACTG 3' =同じ配列であるが、リガンドを有さないオリゴヌクレオチド（参照番号546 nu）

型別判定プロトコールは、実施例8記載の一般的プロトコールに従う。

プローブD1及びD2（表7）が、50%/50%混合物で検出プローブとして用いられる。

結果を下記の表8に示す。

表 8

DNA	型 別 判 定	DR3 545 NU	DR3 545	DR4 546 NU	DR4 546
1	DR11 / DR11	0.019	0.025	0.021	0.025
2	DR4 / DR4	0.018	0.021	0.021	0.138
3	DR8 / DR7	0.017	0.022	0.019	0.019
4	DR3 / DR11	0.026	0.423	0.021	0.027
5	DR3 / DR4	0.023	0.176	0.026	0.296
6	DR3 / DR3	0.023	0.387	0.023	0.018

リガンドのない2つの捕捉プローブは、DNAの特異性を区別せず、一方、リガンドaを有する同じ配列はDNAのDR2及びDR4特異性を同定できる。

実施例10

実施例6記載の方法に従って作られた24のDNAが、実

施例7記載の方法に従って増幅される。

型別判定プロトコールは、実施例8記載の一般的プロトコールに従う。

プローブD1及びD2（表7）が50%/50%混合物で検出プローブとして用いられる。

型別判定プロトコールは、下記の表9にまとめた捕捉プローブを含む。

表 9

参 照	No.	5' - 3' 配列
1	563	CTGGAAAGATGCA
5	603	CAGCAGGATAAGTATG
43	571B	TGGACAACCTACT
9	545	GATACTTCTATCACC
10	398	CCTGATGAGGAGTA
14	591	GGCAGGGTAAGTATAAG
17	595	GGCCCTGGTGGA
44	574B	GCGGTATCTGCACA
45	556B	GGAGGAGGTAAAG
46	555B	TGGAAGACCAGC
48	867B	GGAAGACAAGCG
47	756B	GCGGAGCACTGG
28	802	CCAGGAGGAGAACGT
24	1066	CTCTACGGGTGAGT
27	1068	ACACCTATTGCAGA
52	997B	GAGCTGCGTAAG
37	1033	TTCCTGGAGAGACAC
55	986B	GGAGAGATACTTC
42	1060	AGGAGGACTTGCGC

型別判定の結果を表10に示す。

表 10

プローブ オリゴNo.	1	5	43	9	10	14	17	44	45	46	48	47
DNA No.												
58	0.017	0.025	0.718	0.013	0.029	1.006	0.072	0.033	0.022	0.018	0.015	0.016
59	0.509	0.024	0.036	0.016	0.029	0.929	0.072	0.031	0.025	0.018	0.037	0.018
63	0.014	0.021	0.030	0.011	0.024	0.050	0.030	0.033	0.023	> 2.500	0.016	0.024
66	0.012	0.027	0.066	0.015	0.023	0.992	0.098	0.031	0.024	0.022	0.060	0.016
67	0.468	0.089	0.035	0.042	> 2.500	0.054	0.030	0.032	0.028	> 2.500	0.042	0.015
68	0.017	0.049	0.037	0.025	0.017	0.826	0.068	0.031	0.024	> 2.500	0.120	0.016
70	0.504	0.018	0.027	0.020	0.076	0.016	0.017	0.033	0.031	0.017	0.070	1.674
71	0.011	0.017	0.031	0.025	> 2.500	0.019	0.030	0.032	0.030	> 2.500	0.020	0.021
72	0.459	1.373	0.046	0.025	0.031	0.085	0.015	0.044	0.037	0.017	0.017	0.019
73	0.353	0.890	0.034	0.018	0.016	0.048	0.021	0.044	0.034	0.019	0.015	0.017
75	0.019	-0.052	0.625	1.113	0.044	0.043	0.023	0.033	0.038	0.019	0.018	0.017
78	0.015	0.037	0.625	0.015	0.032	0.589	0.046	0.034	0.031	0.015	0.048	0.019
79	0.014	0.012	0.425	0.013	0.030	0.010	0.015	0.033	0.028	> 2.500	0.039	0.017
80	0.018	0.752	0.041	0.025	0.016	0.448	0.040	0.045	0.030	0.021	0.036	0.016
83	0.014	0.959	0.030	0.022	0.017	0.042	0.536	0.030	0.028	0.073	0.023	0.021
84	0.007	0.013	0.023	0.399	0.015	0.013	0.014	0.031	0.028	1.210	0.042	0.016
85	0.015	0.013	0.468	0.014	0.010	0.018	0.016	0.076	0.034	> 2.500	0.012	0.019
86	0.019	0.747	0.035	0.939	0.023	0.056	0.018	0.041	0.029	0.021	0.070	0.021
87	0.016	1.190	0.035	0.016	0.013	0.046	0.014	0.043	0.029	> 2.500	0.025	0.019
89	0.012	0.032	0.026	0.956	0.015	0.021	0.018	0.032	0.028	0.017	0.014	0.019
90	0.355	0.035	0.031	1.028	0.042	0.038	0.023	0.035	0.036	0.017	0.016	0.022
91	0.866	0.008	0.016	0.014	0.040	0.036	0.015	0.014	0.032	0.020	0.018	0.019
92	0.401	0.015	0.019	0.013	0.010	0.012	0.026	0.021	0.019	0.018	0.014	0.025
95	0.010	0.011	0.048	0.037	0.010	0.017	0.023	0.042	0.016	1.931	1.973	0.024

表 10 (続き)

プローブ オリゴNo.	73	24	27	52	37	55	42	+ 対照
DNA No.	802	1066	1068	997-ASB	1033	986-ASB	1060	
58	0.083	0.026	0.026	0.050	0.759	0.028	0.024	> 2.500
59	0.020	0.022	0.039	0.048	0.035	0.023	0.019	> 2.500
63	0.083	0.881	0.584	0.777	1.194	0.026	0.030	> 2.500
66	0.024	0.023	0.015	0.036	0.030	0.025	0.022	> 2.500
67	0.028	0.028	0.032	0.041	0.893	0.026	0.026	> 2.500
68	0.107	0.015	0.039	0.050	0.105	0.214	0.025	> 2.500
70	0.024	0.028	0.846	0.058	0.952	0.028	0.024	> 2.500
71	0.088	0.022	0.046	0.058	2.363	0.048	0.023	> 2.500
72	0.028	0.024	0.042	0.074	0.070	0.017	0.446	> 2.500
73	0.024	0.023	0.030	0.135	0.045	0.018	0.424	> 2.500
75	0.099	0.029	0.025	0.729	0.031	0.017	0.021	> 2.500
78	0.095	0.013	0.026	0.060	0.813	0.015	0.020	> 2.500
79	0.117	0.028	0.034	0.744	0.912	0.019	0.019	> 2.500
80	0.030	0.021	0.066	0.040	0.045	0.014	0.412	> 2.500
83	0.040	2.096	0.060	0.038	0.058	0.023	0.501	> 2.500
84	0.152	0.021	0.049	0.041	0.011	0.210	0.019	> 2.500
85	0.219	0.070	0.040	0.612	0.038	0.168	0.024	> 2.500
86	0.030	0.024	0.055	0.100	0.036	0.034	0.022	> 2.500
87	0.183	0.048	0.096	0.595	0.047	0.015	0.024	> 2.500
89	0.026	0.617	0.301	0.042	0.567	0.019	0.024	> 2.500
90	0.026	0.024	0.032	0.042	0.016	0.018	0.026	> 2.500
91	0.028	0.026	0.042	0.048	0.032	0.014	0.025	> 2.500
92	0.156	0.039	0.028	1.157	0.021	0.312	0.023	> 2.500
95	0.154	0.079	0.028	1.224	0.023	0.302	0.022	> 2.500
DNA No.								
58								DRB1*0301/DRB1*07
59								DRB1*0101-0102/DRB1*07
63								DRB1*12/DRB1*1301
66								DRB1*07/-
67								DRB1*01/DRB1*11
68								DRB1*07/DRB1*1302
70								DRB1*1401/DRB1*0101-0102
71								DRB1*11/DRB1*1301
72								DRB1*0101/DRB5*0101
73								DRB1*0101/DRB5*0101
75								DRB1*0301/DRB1*04
78								DRB1*0301/DRB1*07
79								DRB1*0301/DRB1*1301
80								DRB1*07/DRB5*0101
83								DRB1*08/DRB5*0101
84								DRB1*04/DRB1*1302
85								DRB1*03/DRB1*13
86								DRB1*04/DRB5*0201-0202
87								DRB1*1301/DRB5*0201-0202
89								DRB1*04/DRB1*12
90								DRB1*0101/DRB1*04
91								DRB1*0101/-
92								DRB1*0101/DRB1*1402
95								DRB1*1302/DRB1*1303

記述した方法は、テストされた24のDNAを曖昧でなく型別判定することを可

能にする。

実施例 11

本発明で記述されるHLA-D R型別判定のための好ましいハイブリッド化温度は、37℃である。しかし、このハイブリッド化温度を変えることができる。

下記の実施例は、ハイブリッド化温度が37℃から45℃に変えられた他は、実施例10と同じである。型別判定は、11のDNAについて行われる。

用いられた捕捉プローブを、下記の表11に示す。

表 11

参 照	No.	5' - 3' 配 列
1	563	C T G G A A A G A T G C A
5	603	C A G C A G G A T A A G T A T G
4 3	571B	T G G A C A A C T A C T
9	545	G A T A C T T C T A T C A C C
1 0	398	C C T G A T G A G G A G T A
1 4	591	G G C A G G G T A A G T A T A A G
1 7	595	G G C C C T G G T G G A
4 4	574B	G C G G T A T C T G C A C A
4 5	556B	G G A G G A G G T T A A G
4 6	555B	T G G A A G A C G A G C
4 8	867B	G G A A G A C A A G C G
4 7	756B	G C G G A G C A C T G G
2 8	802	C C A G G A G G A G A A C G T

型別判定の結果を下記の表12に示す。

表 12

プローブ オリゴNo.	1	5	43	9	10	14	17	44	45
DNA No.	563	603	571-ASB	545	398	591	595	574-ASB	556-ASB
71	0.003	0.003	0.025	0.006	0.805	0.004	0.008	0.003	0.033
72	0.099	1.200	0.035	0.002	0.005	0.012	0.007	0.008	0.039
73	0.099	1.035	0.023	0.001	0.007	0.012	0.007	0.009	0.036
75	0.005	0.022	0.114	0.171	0.009	0.013	0.009	0.004	0.040
78	0.005	0.014	0.126	0.001	0.006	0.704	0.008	0.003	0.037
79	0.007	0.005	0.148	0.006	0.007	0.007	0.009	0.005	0.036
80	0.007	1.135	0.025	0.003	0.008	0.525	0.008	0.009	0.044
83	0.008	1.012	0.020	0.008	0.011	0.029	0.060	0.022	0.058
84	0.009	0.011	0.022	0.194	0.010	0.020	0.019	0.015	0.053
85	0.009	0.006	0.102	0.003	0.012	0.022	0.020	0.016	0.058
86	0.004	0.924	0.022	0.182	0.011	0.033	0.021	0.018	0.067

プローブ オリゴNo.	46	48	47	28	+対照	型別判定
DNA No.	555-ASB	867-ASB	756-ASB	802		
71	0.583	0.016	0.009	0.039	> 2.500	DRB1*11/DRB1*1301
72	0.012	0.010	0.009	0.013	> 2.500	DRB1*0101/DRB5*0101
73	0.005	0.011	0.013	0.017	> 2.500	DRB1*0101/DRB5*0101
75	0.011	0.007	0.010	0.045	> 2.500	DRB1*0301/DRB1*04
78	0.005	0.005	0.006	0.062	> 2.500	DRB1*0301/DRB1*07
79	0.790	0.013	0.009	0.122	> 2.500	DRB1*0301/DRB1*1301
80	0.010	0.012	0.008	0.016	> 2.500	DRB1*07/DRB5*0101
83	0.029	0.021	0.021	0.040	> 2.500	DRB1*08/DRB5*0101
84	0.452	0.020	0.019	0.166	> 2.500	DRB1*04/DRB1*1302
85	0.564	0.023	0.021	0.244	> 2.500	DRB1*03/DRB1*13
86	0.017	0.017	0.020	0.038	> 2.500	DRB1*04/DRB5*0201-0202

実施例 12

実施例 8 で記載したように H L A - D R 型別判定のために用いられた好ましいハイブリッド化緩衝液 (P E G 緩衝液と呼ばれる) は、下記の組成を持つ : 0.1 M リン酸ナトリウム、pH7.0、0.5M NaCl、0.65% Tween 20、0.14mg/m l サケ精子 DNA (Sigma D 9156)、2% P E G 4000 (Merck 807490)。

ホルムアミドを含む (最終10%) 同じ緩衝液が用いられた。ホルムアミドは、ハイブリッド化温度を下げることができると知られている。

もしハイブリッド化がホルムアミドの存在下でなお37℃で行われるなら、従って検出の特異性は増大されるはずである。

型別判定は、実施例10で用いられた24のDNAについて行われる。

用いられた捕捉プローブ及び得られた値を下記の表13に示す。

表 13

アローブ	1	5	43	9	10	14	17	44	45	46	48	47
オリコNo.	563	603	571-ASB	545	398	591	595	574-ASB	556-ASB	555-ASB	867-ASB	756-ASB
DNA No.												
58	0.004	0.015	0.075	0.005	0.005	0.467	0.005	0.005	0.008	0.008	0.020	0.008
59	0.084	0.015	0.016	0.004	0.005	0.426	0.007	0.006	0.007	0.008	0.018	0.007
63	0.009	0.008	0.019	0.008	0.010	0.007	0.006	0.008	0.009	0.351	0.020	0.009
66	0.007	0.022	0.017	0.009	0.008	0.684	0.005	0.006	0.005	0.009	0.018	0.008
67	0.118	0.039	0.017	0.015	0.356	0.027	0.008	0.004	0.004	0.343	0.016	0.004
68	0.010	0.015	0.020	0.010	0.009	0.445	0.004	0.002	0.008	0.332	0.012	0.007
70	0.105	0.009	0.016	0.010	0.010	0.011	0.009	0.008	0.009	0.008	0.014	0.340
71	0.007	0.007	0.018	0.011	0.393	0.010	0.006	0.007	0.012	0.344	0.015	0.005
72	0.085	0.395	0.018	0.008	0.008	0.007	0.007	0.009	0.015	0.007	0.018	0.004
73	0.094	0.353	0.017	0.010	0.009	0.012	0.006	0.008	0.005	0.007	0.019	0.008
75	0.009	0.014	0.062	0.132	0.010	0.011	0.005	0.004	0.008	0.008	0.020	0.009
78	0.006	0.009	0.074	0.011	0.008	0.415	0.006	0.012	0.006	0.004	0.012	0.006
79	0.005	0.006	0.043	0.005	0.004	0.005	0.007	0.005	0.009	0.388	0.014	0.005
80	0.003	0.213	0.013	0.003	0.002	0.211	0.008	0.006	0.010	0.011	0.012	0.008
83	0.007	0.391	0.015	0.005	0.005	0.005	0.023	0.008	0.012	0.015	0.010	0.004
84	0.004	0.008	0.013	0.110	0.005	0.007	0.003	0.006	0.005	0.410	0.018	0.002
85	0.007	0.007	0.033	0.007	0.006	0.006	0.006	0.003	0.008	0.371	0.018	0.005
86	0.009	0.203	0.020	0.081	0.007	0.005	0.005	0.005	0.009	0.048	0.016	0.005
87	0.008	0.289	0.015	0.009	0.008	0.008	0.006	0.004	0.004	0.323	0.014	0.006
89	0.008	0.010	0.015	0.091	0.002	0.004	0.007	0.005	0.012	0.009	0.013	0.007
90	0.033	0.007	0.015	0.075	0.003	0.009	0.007	0.004	0.001	0.008	0.014	0.008
91	0.077	0.006	0.013	0.006	0.005	0.006	0.009	0.006	0.013	0.009	0.015	0.002
92	0.042	0.009	0.013	0.009	0.006	0.007	0.008	0.009	0.005	0.012	0.017	0.003
95	0.005	0.004	0.015	0.006	0.006	0.006	0.008	0.002	0.008	0.319	0.308	0.005

表 13 (続き)

プローブ オリゴNO.	23	24	27	52	37	42	+	対照	DNA No.	型別判定
DNA No.	802	1066	1068	997-ASB	1033	1060				
58	0.036	0.005	0.001	0.004	0.207	0.009	> 2.500		58	DRB1*0301/DRB1*07
59	0.002	0.006	0.008	0.004	0.069	0.010	> 2.500		59	DRB1*0101-0102/DRB1*07
63	0.026	0.115	0.058	0.029	0.261	0.011	> 2.500		63	DRB1*12/DRB1*1301
66	0.007	0.005	0.007	0.008	0.012	0.010	> 2.500		66	DRB1*07/-
67	0.009	0.005	0.008	0.009	0.251	0.024	> 2.500		67	DRB1*01/DRB1*11
68	0.036	0.006	0.009	0.010	0.016	0.011	> 2.500		68	DRB1*07/DRB1*1302
70	0.008	0.004	0.055	0.008	0.199	0.009	> 2.500		70	DRB1*1401/DRB1*0101-0102
71	0.034	0.003	0.005	0.009	0.539	0.008	> 2.500		71	DRB1*11/DRB1*1301
72	0.010	0.009	0.006	0.004	0.009	0.130	> 2.500		72	DRB1*0101/DRB5*0101
73	0.010	0.009	0.005	0.005	0.010	0.150	> 2.500		73	DRB1*0101/DRB5*0101
75	0.038	0.008	0.008	0.021	0.014	0.010	> 2.500		75	DRB1*0301/DRB1*04
78	0.041	0.007	0.004	0.007	0.254	0.015	> 2.500		78	DRB1*0301/DRB1*07
79	0.054	0.007	0.006	0.028	0.315	0.012	> 2.500		79	DRB1*0301/DRB1*1301
80	0.007	0.008	0.009	0.008	0.011	0.142	> 2.500		80	DRB1*07/DRB5*0101
83	0.010	0.166	0.007	0.009	0.017	0.159	> 2.500		83	DRB1*08/DRB5*0101
84	0.050	0.006	0.008	0.010	0.014	0.009	> 2.500		84	DRB1*04/DRB1*1302
85	0.063	0.009	0.007	0.036	0.009	0.011	> 2.500		85	DRB1*03/DRB1*13
86	0.014	0.008	0.004	0.011	0.010	0.010	> 2.500		86	DRB1*04/DRB5*0201-0202
87	0.042	0.007	0.005	0.028	0.007	0.004	> 2.500		87	DRB1*1301/DRB5*0201-0202
89	0.008	0.068	0.039	0.005	0.201	0.006	> 2.500		89	DRB1*04/DRB1*12
90	0.008	0.011	0.009	0.006	0.010	0.009	> 2.500		90	DRB1*0101/DRB1*04
91	0.010	0.010	0.006	0.008	0.009	0.011	> 2.500		91	DRB1*0101/-
92	0.040	0.007	0.012	0.028	0.018	0.012	> 2.500		92	DRB1*0101/DRB1*1402
95	0.035	0.008	0.009	0.030	0.017	0.009	> 2.500		95	DRB1*1302/DRB1*1303

好ましいハイブリッド化温度は37℃であり、好ましいハイブリッド化緩衝液はPEG緩衝液である。しかし、実施例11と12の結果が示すように、ハイブリッド化温度とハイブリッド化緩衝液の両者を変えることが可能であることが判

る。

上述の記載から明らかなように、本発明の方法は、下記の実際的利点を結合する。総ての対立遺伝子の区別の可能性を伴う最適な特異性、

血清学的分析に比べて実施の単純さと低減されたコスト、

増幅後約90分間で結果が得られる迅速な実施、12時間未満の合計期間に等しい（これは腎臓提供者にとって重要である）、

個人の型別判定との両立性（これは緊急の型別判定及び小さな実験室での使用にとって重要である）、

光学密度の測定及び適当な場合には単純なコンピュータ化システムを用いる結果の処理により定量化できる信号、及び自動化システムへの適合性。

実施例13

上記と同様の方法で、引用番号101、102、103、104、115および111を付されたそれらオリゴヌクレオチドに対応する捕捉プローブが調製された。

これらプローブは、捕捉プローブとして用いられるとき、本明細書で示したようにそれらの特異性を同定する。

また、下記の検出プローブと共に本発明の捕捉プローブを用いることができる：

- G C G G T G A C G G A G C T G G
- G A A C A G C C A G A A G G A C .

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 96/00836

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0,A,92 10589 (HOFFMANN LA ROCHE) 25 June 1992	1,2,9-12
Y	see the whole document	3-8,13
X	W0,A,93 09245 (UNIV PITTSBURGH) 13 May 1993	1,2,9-12
Y	see the whole document	3-8,13
X	W0,A,92 08117 (APPLIED BIOSYSTEMS) 14 May 1992	1,2,9-12
Y	see the whole document	3-8,13
X	W0,A,92 12996 (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 6 August 1992 see the whole document	1,2
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 November 1996		Date of mailing of the international search report 22. 11. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 96/00836

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, A, 0 459 532 (CETUS CORP) 4 December 1991	1, 2, 9-12
Y	see the whole document ---	3-8, 13
Y	FR, A, 2 679 252 (BIO MERIEUX) 22 January 1993 see the whole document ---	3-8, 13
A	EP, A, 0 472 399 (MITSUI PETROCHEMICAL IND ; KITASATO INST (JP)) 26 February 1992 see the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR 95/00836

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9210589	25-06-92	AU-B- 656161	27-01-95
		AU-A- 9136191	08-07-92
		CA-A- 2075037	07-06-92
		EP-A- 0514534	25-11-92
		JP-T- 6505625	30-06-94
		US-A- 5567809	22-10-96
WO-A-9309245	13-05-93	EP-A- 0656065	07-06-95
		JP-T- 7500734	26-01-95
WO-A-9208117	14-05-92	NL-A- 9002259	18-05-92
		EP-A- 0553247	04-08-93
WO-A-9212996	06-08-92	AU-A- 1271692	27-08-92
		CA-A- 2101065	23-07-92
		EP-A- 0568623	10-11-93
		EP-A- 0722738	24-07-96
		JP-T- 6507384	25-08-94
EP-A-0459532	04-12-91	EP-A- 0459533	04-12-91
		AT-T- 125307	15-08-95
		AU-B- 594130	01-03-90
		AU-A- 6996287	17-09-87
		CA-A- 1284931	18-06-91
		DE-D- 3751423	24-08-95
		DE-T- 3751423	14-12-95
		DE-D- 3777213	16-04-92
		EP-A- 0237362	16-09-87
		HK-A- 145894	30-12-94
		JP-A- 7313197	05-12-95
		JP-A- 62214355	21-09-87
		SG-A- 132994	13-01-95
		US-A- 5567809	22-10-96
		US-A- 5541065	30-07-96
		US-A- 5468613	21-11-95
		US-A- 5310893	10-05-94
FR-A-2679252	22-01-93	AU-B- 659866	01-06-95
		AU-A- 2388592	23-02-93
		CA-A- 2091775	18-01-93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International publication No
PCT/FR 96/00836

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2679252		EP-A- 0549776	07-07-93
		WO-A- 9302213	04-02-93
		JP-T- 6501622	24-02-94

EP-A-0472399	26-02-92	CA-A- 2049449	21-02-92
		JP-A- 5276954	26-10-93
		JP-A- 8205899	13-08-96

フロントページの続き

- (72)発明者 マンドランド, ベルナルド, ファビアン
フランス国 69100, ビリュルバン, リュ
デ ラ ドウア 21
- (72)発明者 ティエルシー, ジャンーマリエ
スイス国 1224, シェンブジェリス, ア
ブニュ ガスパリン 6